

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02016

研究課題名(和文) 生体分子に着目した“化石種にも使える”高精度有孔虫Mg/Ca水温計の開発

研究課題名(英文) Development of high-accurate Mg/Ca paleo-thermometer based on activity of key biomolecules for calcification

研究代表者

氏名 由利香(Ujiie, Yurika)

高知大学・教育研究部自然科学系理工学部門・教授

研究者番号：20573041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：浮遊性有孔虫殻のMg/Ca比は、古水温計として使用されているが、同じ水温条件下でも種によってMg/Ca比が異なり、生物による代謝の違いが関係していると考えられてきた。そこで本研究では、Ca²⁺膜輸送体に着目し、それらの発現や機能が水温に対してどのように変化するか、分子生物学と地球化学の手法で検証した。異なる水温条件下で飼育した個体を用いてqPCR分析を行った結果、Ca²⁺膜輸送体遺伝子の発現レベルは、水温の上昇とともに低下することがわかった。また、Ca²⁺膜輸送体タンパク質の温度(水温)に対する活性評価の実験系の構築、浮遊性有孔虫のチャンバーごとの正確な微量元素/Caの測定方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有孔虫の石灰化に関する代謝系の理解は、世界でも最先端の研究テーマである。本研究は、石灰化について鍵となる遺伝子の発現の変化まで踏み込んだ検証をしているだけでなく、殻の微量元素の分析を行うことでCa²⁺の挙動を相互に検証した。これは生物学・地球化学の複合的研究であり、今後の発展的研究の礎となった。さらに、水温計となる浮遊性有孔虫殻のMg/Ca比は、過去の地球環境変動の復元に役立つだけでなく、現在深刻化する地球温暖化の環境変化が石灰化生物へもたらす影響を検証するうえでも有用な指標となる。

研究成果の概要(英文)：The Mg/Ca ratio of planktonic foraminiferal tests is widely used as the paleoenvironmental indicator. However, this ratio is not equal among species, even though they calcify under the same temperature condition, probably due to the metabolic differences. This study focused on the functional change of plasma-membrane Ca²⁺ transporter (PMCA), a key protein for Ca²⁺ excretion toward the calcification site, depending on water temperature. By using wild planktonic specimens calcifying during laboratory-culturing and the culture-strain samples of benthic foraminifers, we conducted molecular and geochemical analyses. Our qPCR analyses showed downregulation of the expression levels of foraminiferal PMCA in increasing water temperature. This result is congruent with the Mg/Ca ratio trend shown by the previous geochemical analyses. Moreover, this study challenged to examine activity of PMCA protein and to develop the method to measure trace elements/Ca chamber-by-chamber precisely.

研究分野：分子古生物学

キーワード：カルシウムイオン 石灰化 有孔虫 タンパク質 微量元素

1. 研究開始当初の背景

有孔虫は、石灰質 (CaCO_3) の殻を形成する海洋生物であり、殻は微化石として海底堆積物中に保存され、数億年間に及ぶ化石記録を構築してきた。この石灰質殻は、海水中の溶存イオンを原材料として、カルシウムイオン (Ca^{2+}) と同価の微量元素 (マグネシウム: Mg^{2+} など) も含んでいる。その中で、殻中の Mg/Ca 比は生息水温と相関があり、殻中 Mg/Ca 比と水温の関係式を立てることで、古水温計として使用されてきた (例: Dueñas-Bohórquez et al., 2009; Gray and Evans, 2019)。しかし、同じ水温条件下でも、殻中の Mg/Ca 比は種によって異なり、その違いはバイオミネラリゼーション (生体鉱物化作用) における代謝の違いに起因すると考えられてきた。多くの先行研究は、殻中の Mg/Ca 比が海水中よりも 5 倍以上低いという点に着目し、生体内での Mg^{2+} の挙動、特に Mg^{2+} の放出が鍵になると予測してきた (例: Bentov and Erez, 2006)。そうした中、本研究の代表者らは、ロタリダ目 (古水温指標に用いられる有孔虫が含まれる目) に属する有孔虫についてトランスクリプトーム解析 (網羅的遺伝子発現解析) を行い、殻形成時に有意に発現する遺伝子群を特定し、それらの代謝経路の推定に成功した (Ujiié et al., in press)。その結果、 Mg^{2+} に関連するタンパク質はミトコンドリア調節のみに高い活性を示し、細胞外の殻形成場に Mg^{2+} を能動的に放出していないことがわかった。一方、 Ca^{2+} 膜輸送体、特に細胞外の殻形成場に Ca^{2+} を放出するイオンチャネル (タンパク質) の発現は、殻形成時に顕著に高い活性を示した。したがって、 Ca^{2+} の細胞外への排出が“鍵”となり、殻の Mg/Ca 比は分母のカルシウムの挙動で大きく左右される可能性があることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、有孔虫の石灰質殻の形成に重要な役割を果たす Ca^{2+} 膜輸送体に着目し、異なる水温条件下で飼育した浮遊性有孔虫を用い、①水温に対する Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の発現量の関係、②熱 (水温) に対する Ca^{2+} 膜輸送体タンパク質の活性、③殻中の Mg/Ca 比の違い、について調べ、殻形成に関する生体分子の働きと殻組成の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

有孔虫は一般的に継代飼育が難しく、浮遊性有孔虫に関しては野生個体を採取して実験に供する必要がある。また、有孔虫はゲノム情報がほとんどなく、代謝系の解明に用いられるトランスクリプトーム解析の例も少ない。そこで、遺伝子やタンパク質関連の実験には、浮遊性有孔虫の試料採取・飼育実験のほか、本研究の代表者らが確立したロタリダ目 (浮遊性有孔虫も同目) の底生有孔虫 (*Ammonia beccarii*) の継代飼育による培養株を用い、また殻中の元素分析には表層堆積物中の化石個体も用いた。

(1) 浮遊性有孔虫試料の採取・飼育実験

高知県土佐湾沖でプランクトンネットを用いて試料を採取し、その後、顕微鏡下で研究対象とする浮遊性有孔虫種を単離した。1 個体ずつ濾過海水を満たしたガラスボトルに入れて水温の異なるインキュベーター内で飼育した。飼育条件は 12 時間明暗サイクル、餌にはアルテミアなどを毎朝与えた。個体は倒立顕微鏡で観察して、新しい殻室 (チャンバー) の形成を始めた個体を識別し、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で洗浄し NAsafe (4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM EDTA, 0.1 M MES, pH 4.6) で固定し、 -80°C で保管した。そのほか、殻室を形成した別の個体は、個体死亡後、殻を回収し殻中の Mg/Ca 比分析用とした。

(2) cDNA 合成・トランスクリプトーム解析・リアルタイム PCR (qPCR) 解析

上記 (1) で採取した試料から、1 個体ずつ SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit (Takara) のプロトコルに従って cDNA 合成した。2 種の浮遊性有孔虫について殻形成時と非形成 (非石灰化) 時のシングルセル cDNA を、MiSeq v.3 600 cycles kit (Illumina Inc.) を用いて 300 bp pair-ends でシークエンスし、トランスクリプトーム解析に供した。また、qPCR 解析では、スタンダードが必要であるため、先行研究 (Ujiié et al., in press) による *A. beccarii* のトランスクリプトーム解析の結果を用い、①石灰化時と非石灰化時に発現遺伝子変動せず、②個体間の発現遺伝子があまり変わらず、③遺伝子重複がない遺伝子を探索した。これらの 3 条件に該当する 2 つの遺伝子とスタンダードとして、Applied Biosystems StepOnePlus™ (ThermoFisher) を使用し、KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems) のプロトコルにしたがって qPCR 解析を行った。

(3) Ca^{2+} 膜輸送体タンパク質の活性評価

有孔虫によるタンパク質の発現、生産、それらの活性評価は、これまで世界でも例がなかった。発現・生産条件などを探索する必要があるため、先行研究 (Ujiié et al., in press) のデータを基に、*A. beccarii* を手法開発に用いた。まず、同種の Ca^{2+} 膜輸送体のタンパク質配列を決定し、シングルセル cDNA を PCR 法で増幅し、DNA をプラスミドに挿入し、タンパク質発現用の大腸菌に導入した。その後、構築した組み換え遺伝子大腸菌を培養し、 Ca^{2+} 膜輸送体のタンパク質の発現・生産条件を調整し、大量生産を行った。大量生産したタンパク質精製し、活性評価実験に利用した。

(4) 殻中の微量元素分析

本研究では、飼育下で形成されたチャンバーについて局所的に分析をするため、フェムト秒レーザー誘導結合質量分析装置 (LA-ICP-MS) による微量元素/Ca 比を測定する手法を開発する必要があった。そのため、太平洋オントンジャワ海台で採取された過去 5000 年間程度に相当する表層堆積物 (海底表層-5.0 cm, 5.0-8.5 cm の 2 層準) から、浮遊性有孔虫殻を拾い出した。堆積物中から産出した有孔虫殻には碎屑粒子が混入し、また飼育個体試料も含めると有孔虫の細胞片などに由来する有機物が付着しているため、殻試料のクリーニング方法を検討した。また、再現性の高いデータを得るため、測定時のレーザーの照射方法などについても検討した。

4. 研究成果

(1) 飼育実験

新型コロナウイルス感染症拡大の影響などがあり、試料採取の機会は限られてしまったが、2020 年から最終年度 2022 年までにかけて、7-8 月、12-2 月を中心に計 12 回の試料採取を行った。試料採取地点は黒潮の影響を受け、夏季と冬季で優占種の構成が異なる。夏季には *Globigerinoides sacculifer* や *Globigerinoides ruber* が多産し、冬季には *Globorotalia inflata* が多産した。これら 3 種と、年間を通じて産出した *Globigerinella siphonifera* や、個体数は少ないが *Globigerina bulloides*、*Globorotalia hirsuta*、*Hastigerina pelagica* なども飼育実験に供した。

飼育実験では夏季試料は 21°C から 29°C、冬季試料は 17°C から 25°C 間を 2-3°C 間隔でインキュベーターの温度設定をした。上記 7 種のうち、特に 3 種 *G. sacculifer* 計 65 個体 (21, 23, 25, 27°C)、*G. inflata* 計 117 個 (17, 19, 21, 23°C)、*G. siphonifera* 計 32 個 (21, 23, 25, 27°C) について、幅広い温度別に十分数の個体でチャンバー形成が認められた (図 1)。

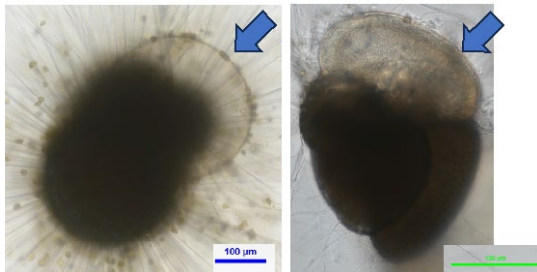


図 1 チャンバー形成の様子。
G. sacculifer (左)、*G. inflata* (右)
矢印部分に、新しいチャンバーが形成されている。

(2) トランスクリプトーム解析

上記 (1) の試料から、*G. sacculifer* と *G. inflata* について殻形成時と非形成時個体間の比較トランスクリプトーム解析を行った結果、殻形成 (石灰化) で高い発現を示す遺伝子群は、先行研究 (Ujii et al., in press) と類似していた。ただし、*G. inflata* では Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の発現が顕著ではなかった。また、底生有孔虫 *A. beccarii* では細胞内の Ca^{2+} 濃度を調整するためにミトコンドリアから排出された Ca^{2+} を小胞内に取り込んでいたが、それらに関連する遺伝子群は有意な高発現ではなかった。浮遊性有孔虫のチャンバー形成は底生有孔虫よりも短い時間で行われており、細胞内に取り込んだ Ca^{2+} の細胞内輸送が底生有孔虫よりも簡略化されている可能性がある。

(3) リアルタイム PCR による発現量解析

G. sacculifer、*G. ruber*、*G. inflata*、*G. bulloides*、*G. siphonifera* について、3 つの温度別で飼育しチャンバー形成をした個体から 2 ~ 4 個体ずつ選び、qPCR 解析を行った。目的としている Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子について RNA 発現量を換算した結果、発現量は、*G. ruber* > *G. sacculifer* > *G. bulloides* > *G. siphonifera* > *G. inflata* で多かった。 Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の発現量を、研究の方法 (2) で示したスタンダードとなる 2 遺伝子 (RPT1: 26S proteasome regulatory subunit T1, DEGS: sphingolipid 4-desaturase/C4-monooxygenase) の発現量で各々比をとったところ、*G. bulloides* の Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子/RPT1 で、*G. ruber* と *G. siphonifera* の Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子/DEGS で外れ値が認められた。これらの外れ値を除くと、飼育水温に対する PMCA 発現量は、*G. sacculifer*、*G. ruber*、*G. bulloides* で逆相関を示し、*G. siphonifera* で正相関を示した (図 2)。*G. inflata* では相関はみられなかった。*G. siphonifera* と *G. inflata* を除いた 3 種では、規格化した Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の発現量は水温と逆相関を示し、 Ca^{2+} が殻へ供給される量が減少していると考えられる。これは、水温が高いほど殻中の Mg/Ca 比が高くなるという地球化学分析 (Dueñas-Bohórquez et al., 2009; Gray et al., 2019) の結果と一致した。

Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の由来と水温との相関関係を調べるため、 Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の系統解析を行った。核遺伝子 (18S) による系統樹では、今回使用した浮遊性有孔虫は大きく 3 つのクレード①*G. ruber*、*G. sacculifer*、②*G. bulloides*、*G. siphonifera*、③*G. inflata* に分かれ、①と②が近縁な系統となる (図 3)。一方、 Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の系統樹では、*G. siphonifera* の Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子には 2 つのパラログが認められ、これら重複遺伝子はそれぞれ①と②と組むことがわかった (図 4)。本研究では、*G. siphonifera* の Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の発現量の検証には、核遺伝子の系統樹を鑑み、②と組む Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子を採用したが、*G. siphonifera* の実際の Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の発現量を過小評価している可能性がある。今後、①に含まれるパラログの RNA 発現量も測定する必要がある。また、*G. inflata* については Ca^{2+} 膜輸送体遺伝子の発現量は他種よりも顕著に低く、トランスクリプトーム解析の結果も合わせ、石灰化機構を見直す必要がある。

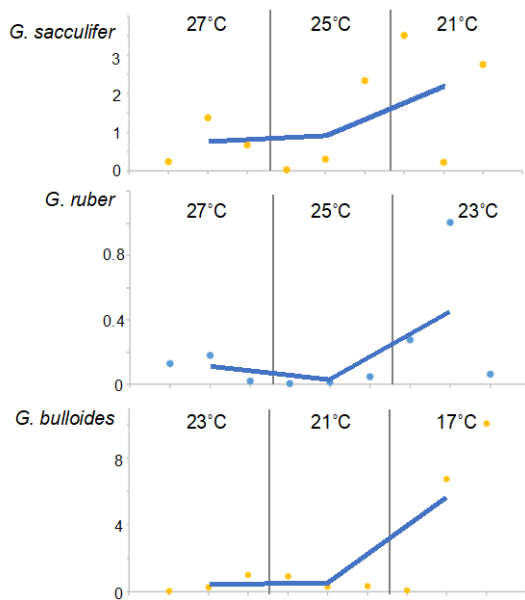
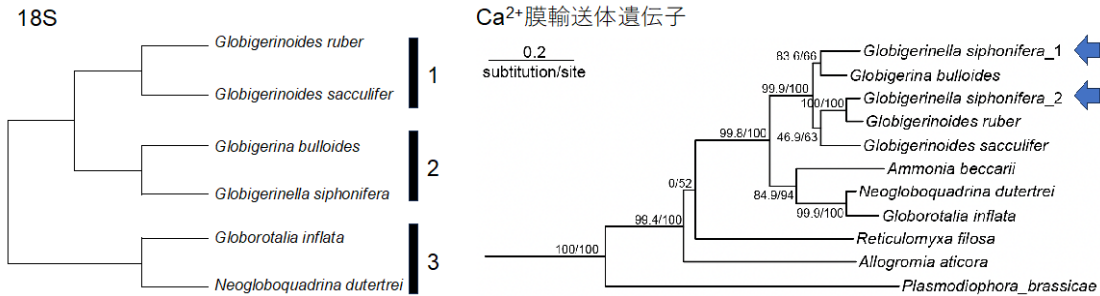


図2 Ca²⁺膜輸送体遺伝子/スタンダード遺伝子による発現比。
各々の種で、同じ水温で飼育・チャンバー形成をした3個体ずつリアルタイムPCR分析を行った。飼育温度は各々の散布図の上部に示す。*G. sacculifer*、*G. ruber*、*G. bulloides*では、水温が低くなるにつれCa²⁺膜輸送体遺伝子/スタンダード遺伝子の比が大きくなる。これはCa²⁺膜輸送体遺伝子の発現量が大きくなっていると考えられる。

図3 (左) 研究対象とした浮遊性有孔虫の18S系統樹。
3つのクレードを1~3で示す。

図4 (右) 研究対象とした浮遊性有孔虫と底生有孔虫のCa²⁺膜輸送体遺伝子の系統樹。
矢印がパラログを示す。



(4) タンパク質活性

A. beccarii のCa²⁺膜輸送体遺伝子を増幅し、プラスミドpMALc5X (NEB)に挿入し、タンパク質発現用の大腸菌 *Escherichia coli* ER2523 (NEB)に導入した。構築した組み換え遺伝子大腸菌を培養し、培養温度や大腸菌の細胞の分解法といった複数の条件でCa²⁺膜輸送体のタンパク質の発現・生産条件を調整し、大量生産を行った(図5)。

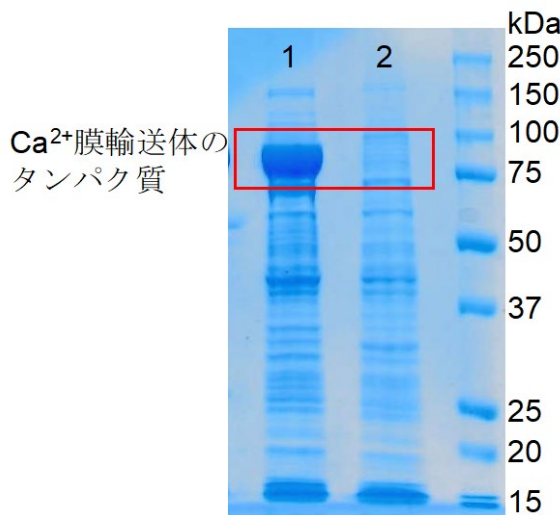


図5 タンパク質の電気泳動の結果。

- 1 : Ca²⁺膜輸送体の発現を誘導された大腸菌のタンパク質抽出物
- 2 : Ca²⁺膜輸送体の発現を誘導されなかった大腸菌のタンパク質抽出物

(5) 殻の微量元素分析

表層堆積物から産出した浮遊性有孔虫の殻試料のクリーニング法として、先行研究(Cheng et al., 2000)に沿って、2つの方法: ①メタノールで超音波洗浄による粒子態の除去、②過酸化水素と水酸化カリウムおよび過塩素酸と水酸化カリウムの混合液による超音波浴槽での酸化的な化学クリーニング、を試験した。②の酸化試験洗浄では、①の洗浄に比べ、その後の微量元素/

その後、2つの活性評価を試験した。まず、Ca²⁺膜輸送体タンパク質ファミリーは、ATP(アデノシン三リン酸)→ADP(アデノシン二リン)変換を行うため、ATPase Activity Assay Kit (BioVision)を用い、ATPなどの基質添加により活性測定を行ったが、活性が確認できなかった。次に、他社のアッセイキットであるATPase Assay Kit (Colorimetric, Abcam)を用いて活性測定を行ったが、同様に活性は検出されなかった。そのため、組み換え大腸菌にOrigami™ B(DE3) (Novagen)およびRosetta-gami B(DE3)株を用い、発現を行った。粗抽出物を用いてATPase Assay Kit (Colorimetric, Abcam)により活性評価を試みたが、活性は検出されなかった。今後、上記の生産物をアミロースカラムにより精製を行うなど、精製法の検討も必要である。

カルシウム比の再現性が高く、不純物を効率的に除去することができた。飼育個体の殻では、上記の化学クリーニングに加え、次亜塩素酸につけて有機物の除去を試みたが、有孔虫の殻は細かい孔が無数にあるため残存物があり、堆積物中の化石個体よりも全体的に値が高くなる傾向があった。今後、別の試薬でタンパク質を分解し、再試験する必要がある。

LA-ICP-MS 分析では、サンゴの骨格とシャコガイの殻から調製した産業総合研究所発行の炭酸塩標準物質 JCp-1 と Jct-1 を用い、レーザーの繰り返し周波数を変えることで、安定した測定を実現した (図 6)。実際、表層堆積物から産出した *O. universa* と *P. obliquiloculata* について同じチャンバーを反復測定したところ、Mg/Ca、Sr/Ca、Na/Ca の平均相対標準偏差がそれぞれ 3.9%、3.4%、10.0% の分析精度が得られた。同分析法をもって、*G. sacculifer* と *G. menardii* についてチャンバーごとに Mg/Ca 比の測定を行い、水温に換算した。*G. sacculifer* は、チャンバーごとの Mg/Ca 比に差がなく、水温変化の小さい表層混合層に分布する生態と一致した (図 7)。ただし、“サック”と呼ばれる最終チャンバーでは、Mg/Ca 比によって見積もられた水温がやや低い傾向があった。これは、“サック”形成時にやや深い水深へ移動していることが考えられた。また、*G. menardii* については、チャンバー間で Mg/Ca 比が異なり、水温に換算すると約 7°C 分に相当した。同種は成長につれて水温が上がっていくため、海洋深部から浅部へ移動しながら成長していることが示唆された。

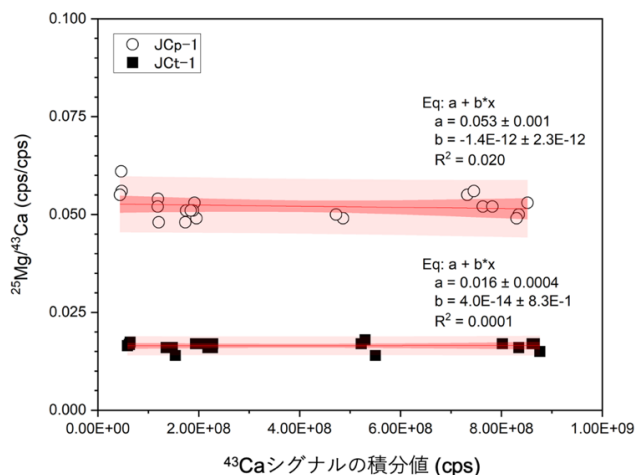
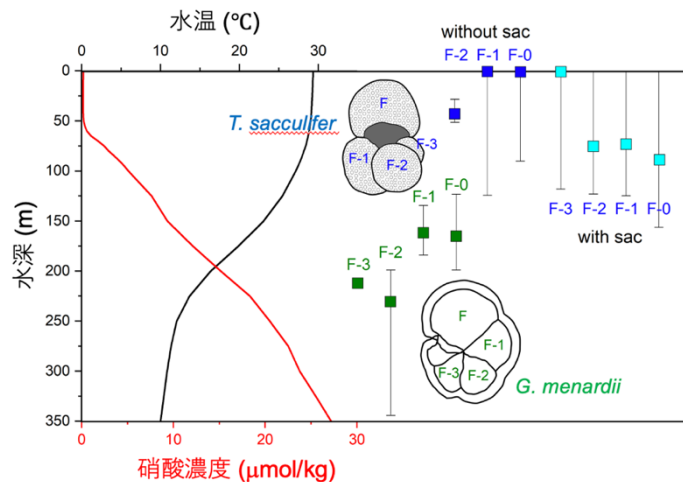


図 6 LA-ICP-MS 分析における炭酸塩標準試料の ^{43}Ca シグナル強度の積分値と、 ^{43}Ca に対する ^{25}Mg シグナル強度比。レーザーの繰り返し周波数を変えることで、 ^{43}Ca の信号強度を変化させたが、幅広いシグナル強度の範囲で試料導入量を変化させても元素比に変化は見られず、安定した測定を実現した。

図 7 *G. sacculifer* と *G. menardii* のチャンバー別 Mg/Ca から換算した両種の生息水深。“サック”は、図中の“F”チャンバーに相当する。



[引用文献]

1. Dueñas-Bohórquez, A., da Rocha, R.E., Kuroyanagi, A., Bijma, J., Reichart, G-J., 2009. Effect of salinity and seawater calcite saturation state on Mg and Sr incorporation in cultured planktonic foraminifera. *Mar. Micropal.*, 73, 178–189.
2. Gray, W.R., Evans, D., 2019. Nonthermal influences on Mg/Ca in Planktonic Foraminifera: A review of culture studies and application to the Last Glacial Maximum. *Paleoceanography and Paleoclimatology*, 34, 306–315.
3. Bentov, S., Erez, J., 2006. Impact of biomineralization processes on the Mg content of foraminiferal shells: A biological. Perspective. *Geochem. Geophys. Geosyst.*, 7, Q01P08
4. Ujiié, Y., Ishitani, Y., Nagai, Y., Takaki, Y., Toyofuku, T., Ishii, S., in press. Unique evolution of foraminiferal calcification to survive global changes. *Science Advances*. Doi: 10.1126/sciadv.add3584
5. Cheng, H., Adkins, J., Edwards, R.L., Boyle, E.A., 2000. U-Th dating of deep-sea corals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 64, 2401-2416

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shunichi Kinoshita, Quan Wang, Azumi Kuroyanagi, Masafumi Murayama, Yurika Ujiie and Hodaka Kawahata	4. 巻 26
2. 論文標題 Response of planktic foraminiferal shells to ocean acidification and global warming assessed using micro-X-ray computed tomography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Paleontological Research	6. 最初と最後の頁 390-404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2517/PR200043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ishitani, Y., Ujiie, Y., Ciacci, C., Frontalini, F. and Inagaki, Y.
2. 発表標題 Time-course analysis of gene expression of a benthic protist during exposure to titanium dioxide nanoscale particles
3. 学会等名 JpGU-AGU Joint Meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村寿紘、常青、大河内直彦、石谷佳之、Ulanova Dana、遠藤博寿、黒田潤一郎、氏家由利香
2. 発表標題 表層堆積物に含まれる浮遊性有孔虫チャンバーの微量元素比の変化と個体差
3. 学会等名 2022年度日本地球化学会第69回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ujiie, Y., Ishitani, Y., Nagai, Y., Takaki, Y., Toyofuku, T., Ishii, S.
2. 発表標題 Unique evolution of foraminiferal calcification to survive global changes
3. 学会等名 AGU Fall Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	遠藤 博寿 (Endo Hirotooshi) (60396306)	鶴岡工業高等専門学校・その他部局等・特命准教授 (51501)	
研究分担者	石谷 佳之 (Ishitani Yoshiyuki) (60772043)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究開発プログラム)・特任研究員 (82706)	
研究分担者	Ulanova Dana (Ulanova Dana) (70610129)	高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・講師 (16401)	
研究分担者	吉村 寿紘 (Yoshimura Toshihiro) (90710070)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋機能利用部門(生物地球化学センター)・研究員 (82706)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------